

·研究简报·

## 长时间离体灌流草鱼脑垂体器官分泌生长激素技术的研究\*

A technique of long-term in vitro perfusion of grass carp pituitaries for separation of growth hormone

陈细华 陈松林 邓文涛

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

Chen Xihua Chen Songlin Deng Wentao

(Yangtze River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000)

**关键词** 灌流技术, 草鱼脑垂体, 器官培养, 生长激素

**Key words** technique of perfusion, grass carp pituitaries, organ culture, growth hormone

鱼类脑垂体合成和分泌的生长激素(Growth Hormone, GH)与鱼类的生长发育调节密切相关。由于外源GH引入鱼体促其生长已成现实<sup>[1]</sup>,在GH免疫化学研究中也必需GH制品,人们常常直接从鱼类脑垂体匀浆中分离提纯GH,但需要消耗过量的脑垂体资源,而通过鱼类脑垂体器官离体培养的途径生产GH已成为诱人的领域并有了一些成功的报道,例如Kishida等、Skarphedinsson等用“静态”培养法分别从有限数量的鳊、虹鳟脑垂体器官培养产物中获得所需要的具有促生长活性、免疫活性的GH<sup>[2,3]</sup>。

我们首创长时间灌流式器官培养方法,并用M199培养液作为灌流液,使草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)脑垂体在82d的时间内保持着强盛不衰的GH产出能力<sup>[4]</sup>。本文选用不依赖于CO<sub>2</sub>培养箱的灌流液对草鱼脑垂体进行长时间灌流培养,旨在为利用鱼类脑垂体器官生产GH建立一种更实用更经济的技术手段。

### 1 材料和方法

将未性成熟的活鲜草鱼成鱼自鳃放血后去头盖骨,细心摘取完整的脑垂体(每个湿重3~4mg),投入无菌的Hanks盐液中清洗数次,然后按每组3个移入灌流装置<sup>[4]</sup>中,在普通培养箱中(25±0.5℃)灌流培养,灌流速度(2±0.1)ml/h。灌流液为含3%小牛血清的Leibovitz L-15液(pH7.3,简称L-15液)。L-15粉和小牛血清均为GIBCO公司产品。连续灌流85d,每天或隔天收集1次样品液(每次收集约0.5ml)。肉眼观察脑垂体的形态变化。样品液经离心收集上层液在-20℃下冻存后,按我们建立的测定技术<sup>[5]</sup>测定其中草鱼GH的浓度。脑垂体(组)GH分泌水平(GH secret-

ing level,简称“GL”)定义为样品的GH浓度与灌流速度的乘积,即单位时间内GH的分泌量。

设2组同步重复实验,取其中1组脑垂体的灌流结果。

### 2 结果和讨论

在85d的连续灌流中,草鱼脑垂体的外部形态除了从第31~32d起可见脑垂体附近保留着数块剥落的半透明薄膜状碎片外,与灌流前相比没有明显的变化;脑垂体的GL值始终维持基本恒定;(1100.2±143.8)ng/h,相当于在85d内从每个脑垂体中获得了约0.75mg的草鱼GH。如此高的GH分泌量暗示着脑垂体在这种灌流条件下具有合成GH的能力。图1表示每隔4~6d的脑垂体的GH分泌水平。

在动物组织培养技术中,不同的器官组织或细胞对培养液的要求不尽相同,而几乎所有类型的培养液中都含定量的NaHCO<sub>3</sub>,构成NaHCO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub>缓冲系统和CO<sub>2</sub>供给系统<sup>[2~4,6]</sup>,因而必须依赖于昂贵的CO<sub>2</sub>培养箱及高纯度的CO<sub>2</sub>气源。灌流式器官培养方法不仅支持NaHCO<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub>缓冲系统<sup>[4]</sup>,而且还为开发应用不含NaHCO<sub>3</sub>的培养液提供了可能性。笔者认为,不断更新的灌流液能为器官组织的生存提供足够的O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>、营养成分和活性物质并缓冲和带走组织代谢过程中所产生的酸性物质。本研究选用不含NaHCO<sub>3</sub>的灌流液—L-15液在普通恒温培养箱中对草鱼脑垂体进行长时间灌流,结果脑垂体保持着较稳定和旺盛的GH分泌能力,证实了L-15液能代替依赖于CO<sub>2</sub>培养箱的灌流液,支持草鱼脑垂体长时间合成和分泌GH。至于在这种灌流条件下草鱼脑垂体到底有多长的功能寿命期及其组织细胞学结构发生什么样的适应性变化,同一批脑垂体材料在两类灌流液中的GH分泌水平是否一致,由此获得的GH是否具有生物活性,有待进一步研究。

收稿日期:1999-01-21

\* 中国水产科学研究院科研基金(96-08-02)资助

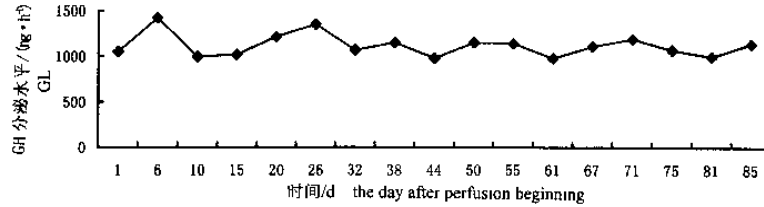


图 1 长时间灌流过程中草鱼脑垂体的 GH 分泌水平

Fig. 1 GH secreting levels of grass carp pituitaries during the period of long-term perfusion

### 参 考 文 献

- 1 林浩然. 鱼类生长和生长激素分泌活动的调节. 动物学报, 1996, 42(1): 69~79
- 2 Kishida M, et al. Isolation of two forms of growth hormone secreted from eel pituitaries in vitro. Gen Comp Endocrinol. 1987, 65: 478~488.
- 3 Skarphedinsson O, et al. Separation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) growth hormone by gel electrophoresis. Gen Comp Endocrinol. 1990, 80: 393~398.
- 4 陈细华, 等. 长时间灌流式器官培养方法. 动物学杂志 1998, 33(6): 31~33
- 5 陈松林, 等. 草鱼生长激素非竞争式酶联免疫吸附测定法的建立及鉴定. 动物学报, 1996, 42(4): 386~393
- 6 鄂 征, 等. 组织培养技术. 第二版. 北京: 人民卫生出版社. 1988